

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCT/JP99/05019

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE

14.09.99

09/787181 JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1998年 9月14日

REC'D 29 OCT 1999

WIPO

PCT

出 願 番 号

Application Number:

平成10年特許願第259783号

出 願 人

Applicant (s):

社団法人北里研究所

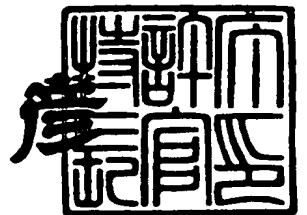
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年10月15日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近 藤 隆 彦



出証番号 出証特平11-3069457

【書類名】 特許願

【整理番号】 K4-001

【提出日】 平成10年 9月14日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 39/39

【発明の名称】 サポニンを含むワクチン製剤

【請求項の数】 9

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区白金五丁目9番1号 社団法人北里研究所内

【氏名】 山田 陽城

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区白金五丁目9番1号 社団法人北里研究所内

【氏名】 清原 寛章

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区白金五丁目9番1号 社団法人北里研究所内

【氏名】 永井 隆之

【発明者】

【住所又は居所】 東京都港区白金五丁目9番1号 社団法人北里研究所内

【氏名】 矢部 武士

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県北本市荒井六丁目111番地 社団法人北里研究所内

【氏名】 相澤 主税

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県北本市荒井六丁目111番地 社団法人北里研究所内

【氏名】 鈴木 雄次郎

【発明者】

【住所又は居所】 埼玉県北本市荒井六丁目111番地 社団法人北里研究所内

所内
【氏名】 諏佐 栄三郎
【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県北本市荒井六丁目 1 1 1 番地 社団法人北里研究
所内
【氏名】 加藤 敏夫
【発明者】
【住所又は居所】 埼玉県北本市荒井六丁目 1 1 1 番地 社団法人北里研究
所内
【氏名】 長峯 隆
【特許出願人】
【識別番号】 390027214
【氏名又は名称】 社団法人 北里研究所
【代表者】 大村 智
【代理人】
【識別番号】 100102978
【弁理士】
【氏名又は名称】 清水 初志
【選任した代理人】
【識別番号】 100108774
【弁理士】
【氏名又は名称】 橋本 一憲
【手数料の表示】
【予納台帳番号】 041092
【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 サポニンを含むワクチン製剤

【特許請求の範囲】

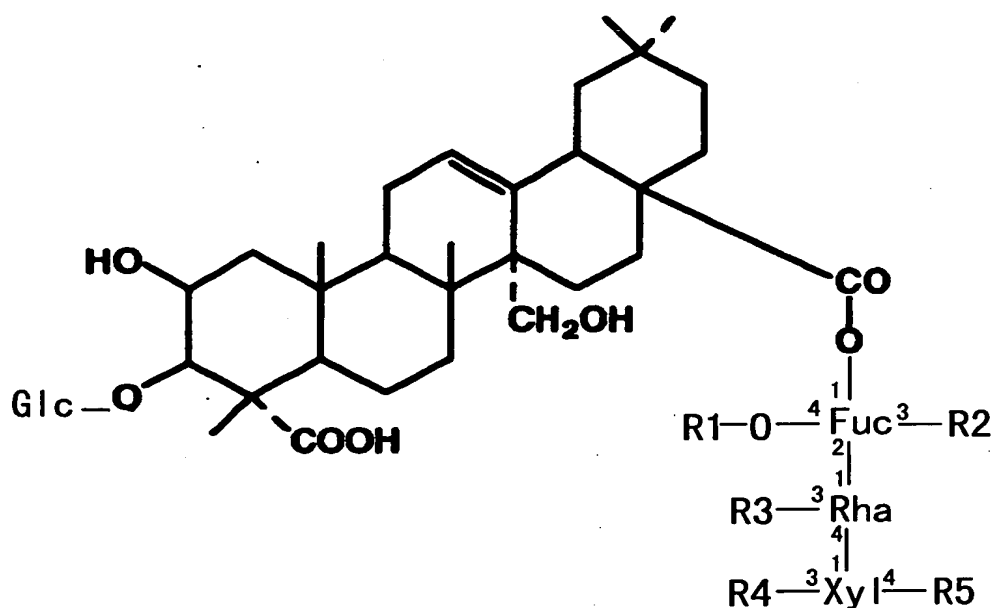
【請求項1】 プレセネゲニン骨格を母核とし、その28位が糖残基または置換糖残基によって置換されているサポニンを含むアジュバント、ただし前記置換糖残基が4置換の場合はアピオース残基を必須の置換基として含む。

【請求項2】 前記サポニンの28位に直接結合する糖残基または置換糖残基が、炭素数3以上の糖残基である請求項1のアジュバント。

【請求項3】 前記サポニンの28位に直接結合する糖残基または置換糖残基が、フコース残基またはその置換体である請求項2のアジュバント。

【請求項4】 サポニンが下記の構造で示される化合物である請求項3のアジュバント。

【化1】



式中、Glcはグルコース残基を、Fucはフコース残基を、Rhaはラムノース残基を、Xylはキシロース残基を表し、

R1は、モノメトキシ桂皮酸残基、またはトリメトキシ桂皮酸残基を、

R2は、Hまたはラムノース残基を、

R3は、Hまたはアピオース残基を、

R4は、Hまたはアラビノース残基を、そして

R5は、Hまたはガラクトース残基を示す。

【請求項5】 サポニンが、以下の群から選択される化合物の少なくとも1種を含むものである請求項4のアジュバント。

R1がモノメトキシ桂皮酸残基、R2がラムノース残基、R3がアピオース残基、R4がH、そしてR5がガラクトース残基である化合物、

R1がトリメトキシ桂皮酸残基、R2、R3、R4がH、そしてR5がガラクトース残基である化合物、

R1がトリメトキシ桂皮酸残基、R2がH、R3がアピオース残基、R4がアラビノース残基、そしてR5がHである化合物、

および、R1がトリメトキシ桂皮酸残基、R2がH、R3がアピオース残基、そしてR4とR5がHである化合物。

【請求項6】 前記サポニンが生薬より調製したサポニンである請求項1～5のいずれかに記載のアジュバント。

【請求項7】 請求項1～6のいずれかに記載のアジュバントを含むワクチン製剤。

【請求項8】 経鼻接種、または経口接種のためのものである請求項7のワクチン製剤。

【請求項9】 免疫抗原成分として、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、おたふくかぜウイルス、エイズウイルス、百日せき菌、ジフテリア菌、ヘリコバクター・ピロリ菌、出血性大腸菌(EHEC)、クラミジア原虫、マイコプラズマ原虫、マラリア原虫、コクシジジウム原虫、および住血吸虫で構成される群から選択される単一または複数の病原微生物の抗原を含む請求項8のワクチン製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、サポニンを有効成分とするアジュバント及びこれを含むヒトおよび動物の病気の予防または治療に有用なワクチン製剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

ワクチンは、種々の疾病の予防に用いられ、天然痘のような特定の疾患に対しては数々の輝かしい成果をあげてきた。しかしながら、ワクチンの副反応や、また効果が充分でないという例も多くあって、その改善が強く望まれている。現在、人体用または動物用に使用されているワクチンの多くは、病原体あるいは病原体の一部を取り出し、ワクチンの抗原材料として用いる。従って、病原体を構成する成分や病原体を増殖させる媒体の成分がワクチンに混入する可能性を否定できない。これはワクチン接種の際、望ましくない副反応を引き起こす原因となりうる。また、免疫賦与に働く抗原部位そのものも多量に接種されると副反応を誘発する場合もある。

【0003】

このようなことをできるだけ避け、安全性に優れたワクチンを製造する方法として、ワクチンの接種量を減少することや、ワクチン抗原の純度を高めること、接種ルートを変えることなどが行われてる。しかし、一般的には、このような変更に伴いワクチンの免疫力が低下しやすい問題点がある。免疫力の低下に対しては、従来、アジュバントを用いることが実施されてきた。しかし、ここでも、アジュバントの有効性と安全性の向上など、改善すべき課題が残っている。

【0004】

従来、ほとんどのワクチンは注射により接種される。この結果、血中抗体価が上昇し、それが持続する場合、病原微生物による病気が予防される。一方、インフルエンザウイルスなど、多くの微生物は気道粘膜を介して感染するので、感染初期段階で罹患を阻止するためには、血中よりも粘膜での局所免疫を強力に誘発するワクチンが望ましい。このためにも局所免疫を誘発しやすくするアジュバントが求められている。すなわち、有効かつ安全で、必要な免疫を誘発しやすくする優れたアジュバントを開発することは、ワクチン開発にとって重要な課題であ

る。

【0005】

注射以外の接種ルートとして注目されるのが、経口接種、あるいは経鼻接種である。注射は医療技術者が行わなければならないので、たとえば医療施設が完備されていない状況で広い範囲にわたってワクチン接種を進めるときには障害となる。これに対して経口接種、あるいは経鼻接種では、ワクチン製剤さえ運搬すれば専門家の指導の下に直接の助けがなくとも接種が可能である。しかし、一般的にこのような接種ルートでは十分な免疫刺激を得にくいいため、やはりアジュバントが必要となる。

【0006】

従来、ワクチンにはアジュバントとしてアルミニウム化合物（硫酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウムなど）が広く用いられて来た。アルミニウム化合物のゲルは、現在、人体用ワクチンに用い得るほとんど唯一のアジュバントである。しかし、アルミニウムアジュバントにはいくつかの問題点があり、改善が求められている。それらを例示すれば、1）製法、及び取り扱い上の問題として、製造のロットごとに品質が異なりやすいので、大量生産に不向きであり、加えてカラム操作に馴染みにくい等取り扱い上も不便である、2）効果上の問題として、液性免疫の誘発力に優れているものの、細胞性免疫の誘発力が低いので、用いる抗原に限界がある、などである。

【0007】

これらの改善を目的として、サポニンなど新しいアジュバントの研究、開発が進められている。それらを例示すれば次のものが挙げられる。

1. サポニン等、界面活性作用物質。
2. コレラトキシン等、細菌毒素。
3. BCG、ムラミルペプチド等、微生物または植物成分。
4. インターロイキンなど、サイトカイン類。
5. 合成ポリアニオン、ポリカチオンなど。
6. マイクロキャリアなど。

【0008】

サポニン類は、植物体に含まれるトリテルペングリコシドやステロイドグリコシドを総称する化合物群である。サポニンを含む植物画分がアジュバント作用を有する場合のあることは古くから知られている。しかし、サポニンは複雑な構造を有し、アジュバント作用以外にも多彩な活性を示すので、いずれのサポニン化合物がアジュバント活性を担うのかを同定することは大きな困難を伴い、現在においても容易なことではない。

【0009】

たとえば植物キラジャ・サポナリアのサポニン画分の一つキルAから、20数種のサポニン化合物が分離され、そのうちQS-21など複数の成分がアジュバント活性を示すことが明らかにされた（公表特許広報(A)、平2-504266）。QS-21は細胞性免疫誘発力が強く、アルミニウムアジュバントの欠点を補うアジュバントとして研究が続けられている。しかし、QS-21は精製が困難で、構造が複雑であり、溶解性にも問題がある。従って、より有効で安価、安全なアジュバントの開発が求められている。たとえばサポニンは一般に強い溶血活性を示す。溶血は、貧血、臓器機能障害、栄養失調、あるいは血栓などの副反応症状の原因となることから、特に注射剤として接種する場合に問題となる。

また本発明者らは、数種の生薬から構成されている漢方薬の抽出液のあるものはアジュバント作用を有し、経鼻接種したインフルエンザワクチンの構成成分として用いた場合、鼻腔洗液中および血清中でインフルエンザウイルスに対する抗体価を上昇させることを明らかにした（H. Yamada and T. Nagai, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 20 (3), 185-192, 1998）。しかし、アジュバント作用が抽出液中のどの化合物によってもたらされているのかについては、未だに明らかにされていない。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の課題は、ワクチンの使用量を減らしたり接種ルートを変えても免疫力が低下しないようなワクチンを製造するため、ワクチンの免疫力を増強させる新しい方法を提供することにある。より具体的には、生薬中のサポニンから、より単純な構造で有効性と安全性の高いサポニンを見い出し、新規アジュバントとし

て開発することにある。漢方薬は中国、日本やアジア各国で長年の臨床使用を通じて有効性と安全性が確立されているので、本課題の材料として優れて好適である。

【0011】

すなわち、本発明の課題は、効果と安全性の高い新規なアジュバントとして、一群のサポニンをアジュバントとして提供し、かつ、これらを含むワクチンを提供し、有効で安全なワクチンの製造に貢献することである。

【0012】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題の達成を目的として、二百数十種の生薬の熱水抽出エキスについて経鼻接種インフルエンザワクチンと同時に接種した場合にアジュバント活性を示すものの検索を行なった。その結果、生薬「遠志（オンジ）」の熱水抽出エキスが最も高い活性を示すことを発見した。更にオンジの熱水抽出エキス中の有効成分の抽出分離と構造解析を進め、特定の構造を持った化合物に強力な免疫刺激活性を見出し、この化合物に高い安全性を期待できることを確認して本発明を完成した。すなわち本発明は、以下のアジュバント、ならびにこのアジュバントを用いたワクチン製剤に関する。

【0013】

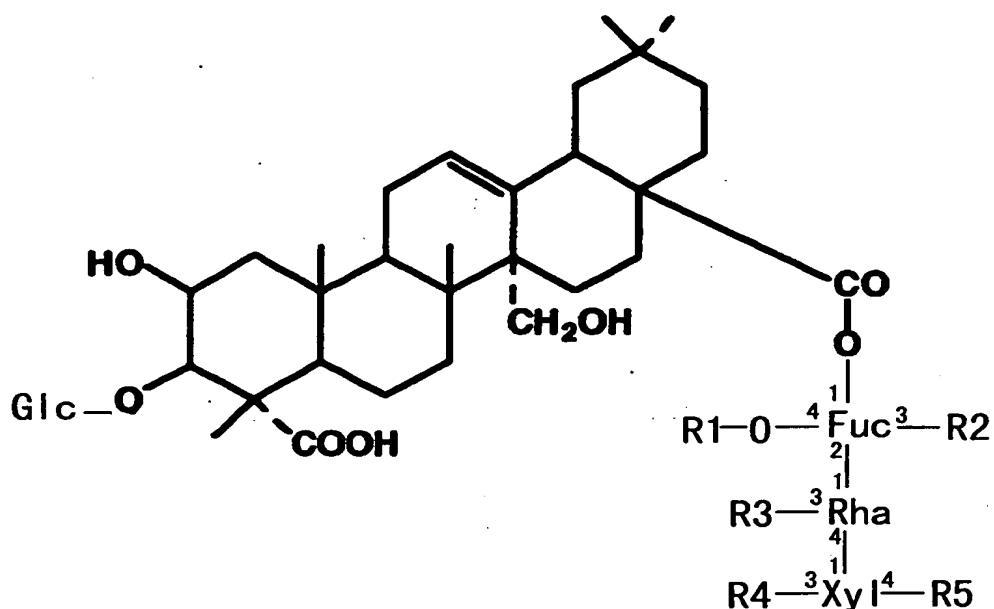
〔1〕 プレセネゲニン骨格を母核とし、その28位が糖残基または置換糖残基によって置換されているサポニンを含むアジュバント、ただし前記置換糖残基が4置換の場合はアピオース残基を必須の置換基として含む。

〔2〕 前記サポニンの28位に直接結合する糖残基または置換糖残基が、炭素数3以上の糖残基である〔1〕のアジュバント。

〔3〕 前記サポニンの28位に直接結合する糖残基または置換糖残基が、フコース残基またはその置換体である〔2〕のアジュバント。

〔4〕 サポニンが下記の構造で示される化合物である〔3〕のアジュバント。

【化2】



式中、Glcはグルコース残基を、Fucはフコース残基を、Rhaはラムノース残基を、Xylはキシロース残基を表し、

R1は、モノメトキシ桂皮酸残基、またはトリメトキシ桂皮酸残基を、

R2は、Hまたはラムノース残基を、

R3は、Hまたはアピオース残基を、

R4は、Hまたはアラビノース残基を、そして

R5は、Hまたはガラクトース残基を示す。

〔5〕サポニンが、以下の群から選択される化合物の少なくとも1種を含むものである〔4〕のアジュバント。

R1がモノメトキシ桂皮酸残基、R2がラムノース残基、R3がアピオース残基、R4がH、そしてR5がガラクトース残基である化合物、

R1がトリメトキシ桂皮酸残基、R2、R3、R4がH、そしてR5がガラクトース残基である化合物、

R1がトリメトキシ桂皮酸残基、R2がH、R3がアピオース残基、R4がアラビノース残基、そしてR5がHである化合物、

および、R1がトリメトキシ桂皮酸残基、R2がH、R3がアピオース残基、そしてR4とR5がHである化合物、

〔6〕前記サポニンが生薬より調製したサポニンである〔1〕～〔5〕のいずれかに記載のアジュバント。

〔7〕〔1〕～〔6〕のいずれかに記載のアジュバントを含むワクチン製剤。

〔8〕経鼻接種、または経口接種のためのものである〔7〕のワクチン製剤。

〔9〕免疫抗原成分として、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、おたふくかぜウイルス、エイズウイルス、百日せき菌、ジフテリア菌、ヘリコバクター・ピロリ菌、出血性大腸菌(EHEC)、クラミジア原虫、マイコプラズマ原虫、マラリア原虫、コクシジウム原虫、および住血吸虫で構成される群から選択される単一または複数の病原微生物の抗原を含む〔8〕のワクチン製剤。

【0014】

本発明によるアジュバントを構成するサポニンは、オレアナン骨格を有するサポニンの一部で、プレセネゲニン(presenegenin)を母核とする一群の化合物である。本母核構造はC A Sの命名法においてolean-12-ene-23, 28-dioic acid, 2, 3, 27-trihydroxy-(2 β , 3 β , 4 α)と記載される。

【0015】

アジュバント活性を有するサポニンとして構造が明らかにされた化合物には、QS-21等が存在する。しかし本発明のサポニンは、QS-21やその類縁サポニンとは明確に異なる。QS-21もオレアナン骨格を有するサポニンの別の一部であるが、その母核はキライン酸(quillaic acid)で、ここに種々の糖、その他が結合した構造を有する。キライン酸母核構造はC A Sの命名法において、olean-12-en-28-oic acid, 3, 16-dihydroxy, 23-oxo-(3 β , 4 α , 16 α)と記述される。すなわち、本発明のアジュバントを構成するサポニンのプレセネゲニン母核は、23, 28-ジカルボキシルであり、かつ2,3,27位に水酸基を有する。一方、キライン酸母核は23-アルデヒド-28-カルボキシルであり、かつ3,16位が水酸基となる点で構造的には明確に区別される。

【0016】

更に本発明によるアジュバントを構成する前記サポニン、母核の28位のカルボキシル基に直接結合している糖残基が特異なアシル基で置換されている点、またこの糖残基が4置換以上であるときにはアピオース残基を必須の置換基として含む点において新規なサポニンアジュバントである。なお本発明において前記糖残基の置換数は、母核への結合を1として含む数を意味する。母核の28位に結合する糖残基としては、炭素数3以上の糖、糖アルコール、または糖酸が望ましい。このような糖残基として、具体的には、グリセロース残基、エリスロース残基、フコース残基（Fucで示す）、グルコース残基（Glcで示す）、およびセドヘプチュロース残基を例示することができる。中でもフコース残基であるときには、溶血活性の低い優れたサポニンが含まれる。28位のカルボキシル基に結合する糖がフコース残基である場合について、特に望ましいサポニンを一般式によって示せば前記のとおりである。これらの母核の28位に結合する糖残基は、更にアシル基、あるいは更に糖残基のような任意の置換基によって置換されていても良い。アシル基としては、モノメトキシ桂皮酸残基（monomethoxycinnamoyl 基、MCで示す）やトリメトキシ桂皮酸残基（trimethoxycinnamoyl 基、TCで示す）を示すことができる。あるいは、乳酸、ピルビン酸、コハク酸等の有機酸、またオレイン酸等の高級脂肪酸による置換を示すこともできる。更に、このアシル基自体が、アミノ基、水酸基、ニトロ基、ニトリル基、リン酸基、あるいはハロゲン等で置換されている化合物を例示することもできる。加えてアシル基が糖残基と結合している化合物も含まれる。一方、置換基として示すことができる糖残基には、ラムノース残基（Rhaで示す）、アピオース残基（Apiで示す）、フコース残基、アラビノース残基（Araで示す）、キシロース残基、グルコース残基（Glcで示す）、グルクロン酸残基、ガラクトン酸残基、マンノース残基、マンニユロン酸残基、およびガラクトース残基を示すことができる。これらの糖残基は、通常は母核の28位に結合する前記フコース残基の2位、3位、および4位のいずれか、もしくは複数の位置に結合することができる。たとえば前記一般式においては、R1がアシル基によって、そしてR2が糖残基によって置換された化合物が例示される。

【0017】

上記のような構造のサポニンが強いアジュバント活性を有することは先行文献の記述からは予測されないことである。たとえばQS-21の構造活性相関研究において、母核の23-アルデヒドが活性発現に重要であるとの見解が報告された (S. Soltysik, J.-Y. Wu, J. Recchia, D.A. Wheeler, M.J. Newman, R.T. Coughlin and C.R. Kensil, Vaccine, 13, 1403-1410, 1995)。しかし、本発明のサポニンはその23位がアルデヒドではなくカルボキシル基であるにもかかわらず、高いアジュバント活性を有する。このことは本発明者らの長年の研究によって初めて明らかにされた新しい知見である。

【0018】

【発明の実施の形態】

本発明のアジュバントを構成するサポニンは、前記構造によって特定されるプレセネゲニン母核を備えた化合物である。本発明で用いられるプレセネゲニン母核を備えたサポニンとして、具体的な物質名を例示すれば、たとえばオンジサポニンA、E、FおよびGを挙げることができる。これらの化合物の構造と製造方法は公知である (S. Sakuma and J. Shoji, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 29, 2431-2441, 1981; S. Sakuma and J. Shoji, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 30, 810-821, 1981)。しかし、これまでワクチンにおけるアジュバント活性は知られていなかった。これらの化合物の構造を特定するために、R1-R5の置換基を表1にまとめた。表中の略号は、前記の置換基を示す。ここで表中に示したオンジサポニンについて、先に述べた母核の28位に結合するフコース残基の置換数を示せば、A:4、E:3、F:3、そしてG:3となる。

【表1】

オンジサポニン	R1	R2	R3	R4	R5
A	MC	Rha	Api	H	Gal
E	TC	H	H	H	Gal
F	TC	H	Api	Ara	H
G	TC	H	Api	H	H

【0019】

本発明に用いるサポニン天然物は、例えば、生薬などの薬用植物を原料として公知の方法を組み合わせ、抽出、分離、精製し、製造することができる。合成化学的手段により製造することもできる。その例を示せば次のとおりである。

【0020】

サポニン含有生薬であるオンジ (*Polygalae Radix*)、その原植物である *Polygala tenuifolia* Willd.、またはその他の同属植物をメタノール、エタノール、ブタノール等の低級アルコール、クロロホルム等の有機溶媒または水で抽出し、溶媒を留去した後、抽出エキスにつきシリカゲルカラムクロマトグラフィーなどで精製を行うことにより本発明に用いるサポニンを得ることができる。また場合によっては、含水有機溶媒で抽出を行った後、ヘキサン等の炭化水素類を用いて脱脂後、クロロホルム、ブタノールまたは水とクロロホルム、水とブタノールなどの混合溶媒で分配し、有機溶媒可溶部の溶媒を留去し、抽出エキスにつきカラムクロマトグラフィーを行うことによっても得ることができる。あるいは必要に応じて、メタノール等を用いて再結晶することも可能である。

【0021】

本発明のアジュバントをワクチンの有効成分として用いる使用形態は特に限定されない。すなわち、公知の種々の適切な使用形態が可能であり、物理的混合や抗原蛋白との化学的結合物でもよい。リポソームなどのキャリアーに内包させてもよい。本発明のアジュバントを構成するサポニンは、1種類で用いても良いし、あるいは複数種を混合して用いることもできる。

【0022】

更に本発明のアジュバントは、公知のアジュバントの1種以上と同時に使用することができる。たとえば実施例5には本発明のサポニンとアルミニウムアジュバントを含む百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンの例を示す。本発明によるアジュバントは、アルミニウムアジュバントとの同時使用においても粘膜免疫活性を誘発する。本発明のアジュバントとして用いるサポニンの種類、あるいは組み合わせるべき公知のアジュバントは、免疫原となる抗原の種類、接種する動物

種、あるいは安全性等の考慮すべき条件に合わせて、好適な組み合わせを経験的に見い出すことができる。その結果、抗原の量を低下させたり、もう一方のアジュバントの量を低下させ、望ましくない副反応を低下させ、望ましい免疫反応を増強することができる。

【0023】

考慮すべき安全性の指標の一つとして、サポニンの溶血活性がある。特にヒトに対して用いる場合には、前記サポニンの中で、たとえばオンジサポニンE、F、およびGとして示したサポニンが溶血活性の低さの点で有利である。これらのサポニンは、28位のカルボキシル基に結合する糖残基がフコースであり、更にフコース残基のR2がHである点において共通の構造を持つ化合物である。しかしながら、オンジサポニンAとして示したようなサポニンの溶血活性は、必ずしも許容されないものではない。たとえば血中に直接移行しにくい接種ルートを選択して用いたり、アジュバントの接種回数を限定して許容できる水準内で用いることが可能である。その他、公知の化学修飾の手法により溶血活性の低い成分（たとえばオンジサポニンE）に誘導したり、その他の誘導体に導くための材料としても利用することができる。

【0024】

本発明によるアジュバントに基づいて、新規なワクチン製剤が提供される。本発明におけるワクチン製剤は、狭義と広義のワクチンを含む。すなわち、1) ヒト及び動物におけるウイルス、細菌、真菌、原虫、その他の微生物による感染症に有効な狭義のワクチンを含む。その一部を例示すれば、インフルエンザワクチン、百日せきワクチン、精製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン、日本脳炎ワクチン、B型肝炎ワクチン、ロタワクチン、麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、麻しん風しんおたふくかぜ混合ワクチン、麻しん風しん混合ワクチン、およびヘモフィルスインフルエンザワクチン等の各種ワクチンが挙げられる。さらには、多剤耐性黄色ブドウ状球菌(MRSA)ワクチン、ヘリコバクターピロリワクチン(以下H.ピロリと省略する)、出血性大腸菌(EHEC)ワクチン、サルモネラワクチン、クラミジアワクチン、マイコプラズマワクチン、エイズワクチン、マラリアワクチン、コクシジウムワクチン、あるいは

住血吸虫ワクチンを含む。2) さらに広義のワクチンとして、がんワクチン、不妊ワクチン、胃潰瘍ワクチン、糖尿病ワクチン及び動脈硬化症ワクチンなど非感染症の予防や治療に有効なワクチンを含む。

【0025】

これらのワクチンは製造方法により分類される種々のワクチンを含む。すなわち、弱毒化生ワクチン、不活化ワクチン、コンポーネントワクチン、DNAに基づくワクチンなどを含む。DNAに基づくワクチンの中には、プラスミドなどのキャリアーに組み込んだDNA断片を含むワクチンのほか、リボザイムやアンチセンスオリゴヌクレオチドなどを併用するワクチンが含まれる。なお、DNA断片、リボザイム、あるいはアンチセンスオリゴヌクレオチドに対しては、本発明のサポニンアジュバントにより透過性の亢進が期待できる。これらのワクチンは、治療用でも予防用でも良い。また、ワクチンの効果にとって有効な抗原成分を遺伝子組み換え技術を用いて組み換え生物細胞に生産させたものを用いる組み換えワクチンも含まれる。これらのワクチンは単味ワクチンでも混合ワクチンでも良い。これらのワクチンの製造方法や使用形態を例示すれば次の通りである。

【0026】

インフルエンザワクチン；発育鶏卵、または、ベロ細胞など動物細胞培養技術により増殖させたウイルスをエーテル、界面活性化剤などで分解精製して得られる、あるいは遺伝子組み換え技術や化学合成によって得られる赤血球凝集素（HA）、ノイラミニダーゼ（NA）、核蛋白質（NP）、マトリックス蛋白質（M）あるいはその一部などを含むスプリットワクチン。または、これらの蛋白質の遺伝子を含むDNA断片をふくむ経鼻接種用DNAワクチン。

【0027】

百日せきワクチン；百日せき菌を培養した培養液あるいは菌体より塩析、超遠心分離などを用いて抽出し、ホルマリンで無毒化した不活化ワクチン、または、遺伝子組み換え技術や変異剤処理で誘起した人工変異株生産物として得られる変異体の百日せき菌毒素（PT）、赤血球凝集素（FHA）、69K膜タンパク質、あるいは、その部分ペプチドなどを含むワクチン。

【0028】

百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン；百日せきワクチンにジフテリアトキソイドおよび破傷風トキソイドを混合した三種混合ワクチン。

【0029】

日本脳炎ワクチン；マウス脳内で増殖したウイルス、またはベロ細胞など動物細胞培養技術により増殖したウイルスを超遠心分離あるいはエチルアルコールなどを用いてウイルス粒子を精製した後、ホルマリンで不活性化したもの、あるいは遺伝子組み換え技術や化学合成などによって得た抗原蛋白質を含むワクチン。

【0030】

B型肝炎ワクチン；B型肝炎キャリアの血液を原材料とし、塩析、超遠心分離を用いてHBs抗原を分離精製したプラズマワクチン、あるいは遺伝子組み換え技術や化学合成などによって得た抗原部位などを含む組み換えワクチン。

【0031】

麻しんワクチン；ニワトリ胎児細胞などの培養細胞、あるいは、発育鶏卵で増殖させた弱毒ウイルス生ワクチン、あるいは、ウイルスの一部、または、遺伝子組み換え技術や化学合成によって得た感染防御抗原を含む組み換えワクチン。

【0032】

風しんワクチン；ニワトリ胎児細胞などの培養細胞、あるいは、発育鶏卵で増殖させたウイルス、あるいは、その一部、または、遺伝子組み換え技術や化学合成によって得た感染防御抗原を含むワクチン。

【0033】

おたふくかぜワクチン；家兎細胞などの培養細胞あるいは発育鶏卵で増殖させたウイルス、または、その一部、あるいは、遺伝子組み換え技術や化学合成によって得た感染防御抗原を含む弱毒生ワクチン。

【0034】

麻しん風しん混合ワクチン；麻しんワクチン、風しんワクチンを混合した二種混合ワクチン。

麻しん風しんおたふくかぜ混合ワクチン；麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチンを混合した三種混合ワクチン。

【0035】

ロタワクチン；MA104細胞など培養細胞で増殖させたウイルス、または患者の糞便中より得たウイルス、または、その一部、あるいは遺伝子組み換え技術や化学合成により得た感染防御抗原を含むワクチン。

【0036】

マイコプラズマワクチン；マイコプラズマ増殖用培地で増殖したマイコプラズマ、または、その一部、あるいは、遺伝子組み換え技術や化学合成などにより得られた感染防御抗原を含むワクチン。

【0037】

エイズワクチン；培養細胞で増殖させたウイルス、または患者より得たウイルス、または、その一部、あるいは遺伝子組み換え技術や化学合成により得た感染防御抗原を含むワクチン、あるいは有効なDNA断片を含むDNAワクチン。

【0038】

H.ピロリワクチン；培養したH.ピロリ菌体の破砕物、または、H.ピロリ培養物から分離したウレアーゼ、熱ショック蛋白質、トキシンなどを抗原とするワクチン、あるいは、遺伝子組み換え技術により生産されたこれらの抗原蛋白質からなる注射用あるいは経口、経鼻接種用ワクチン。

【0039】

上記ワクチンは液状または粉末状で提供される。粉末状とする場合には、凍結乾燥等の手法により、粉末製剤とすることができる。液状製剤であれば、鼻腔内接種（鼻腔内スプレー、滴下、塗布など）や注射の場合に適している場合が多い。あるいは鼻腔内接種の場合は、粉末スプレー方式も可能である。また本発明によるワクチン製剤には、公知の安定剤や防腐剤を配合することができる。安定剤には、0.1-0.2%程度のゼラチンやデキストラン、0.5-1%のグルタミン酸ナトリウム、あるいは約5%の乳糖や約2%のソルビトール等が用いられる。防腐剤としては、0.01%程度のチメロサルや0.1%程度のβ-プロピオノラクトンが公知である。

【0040】

本発明によるワクチン製剤におけるワクチン抗原とサポニンの混合比率としては、たとえば1:0.0001～1:10,000（重量比）を例示することができる。この範囲

はあくまでも一般的な範囲であり、ワクチンの種類に応じて好適な比率を決定して用いる。その為に必要な方法は、この領域の専門家にとって、公知である。

【0041】

本発明のワクチン製剤は、上記免疫原に本発明のアジュバントを所定の量比で混合することにより調製される。調製は厳密に無菌的に行なわなければならない。それぞれの原材料も完全に無菌的でなければならない。勿論、ワクチン作用以外に必要なパイロジェンやアレルギー源となるような夾雑蛋白質は可能な限り除去しておかなければならない。この領域の専門家にとって、その為に必要な方法は公知である。本発明のワクチン製剤は、ワクチン抗原と本発明のサポニンをそれぞれ別々に調製、製剤化しておき、用時に混合してから接種するか、または、別々に、ほぼ同時に接種するという方法によっても、効果を発揮させることができる。

【0042】

ワクチン接種法

本発明によるワクチン製剤の使用方法は公知のどの方法も使用できる。

接種量はマウスの場合、鼻腔内で5 μ L~50 μ L、ヒトの場合は鼻腔内接種、注射いずれの場合も0.1~1.0 mLが好適である。これらの量は適宜変更し得る。また、免疫抗原との組み合わせについては、たとえば、次に示すような免疫抗原では、ワクチン効果の点で、あるいは接種操作の点で、経鼻接種や経口接種が望ましいとされている。

インフルエンザウイルス、ロタウイルス、麻しん、風しん、おたふくかぜ、エイズ、百日せき菌、ジフテリア、H.ピロリ、出血性大腸菌(EHEC)、クラミジア、マイコプラズマ、マラリア原虫、コクシジウム原虫、および住血吸虫。

これらの免疫抗原は、単独で接種される場合もあるし、百日せき・ジフテリア・破傷風三種混合ワクチン、あるいは麻しん・風しん二種混合ワクチンのような形で同時接種の形を採用することもできる。経鼻接種や経口接種が望ましい理由は、いずれも気道や消化管の粘膜が感染ルートとなっているためである。感染ルートである局所粘膜における免疫機構を誘導するためには、それに適した免疫刺激活性の強いアジュバントが望ましい。あるいは、マラリア原虫ワクチンのように

必ずしも十分な医療設備の期待できない地域で利用される機会が多いワクチンについては、医者や看護婦といった専門の医療技術者でなくとも接種が可能な経鼻接種や経口接種といった接種ルートが望まれる。以下本発明の実施例を示すが、本発明は何らこれらに限定されるものではない。

【0043】

【実施例】

実施例 1. サポニンの調製 - 1

オンジサポニン A、E、F および G の製造方法を示す。オンジサポニン A、E、F および G は、庄司らの方法 (S. Sakuma and J. Shoji, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 29, 2431-2441, 1981; S. Sakuma and J. Shoji, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 30, 810-821, 1981) に準じて製造した。

【0044】

すなわち、オンジ (500g) をメタノール 1 L を用いて還流し、メタノール可溶性画分を得た。残渣について同様の操作を 6 回繰り返し、メタノール可溶性画分を減圧乾固することによりメタノールエキスを得た (収量; 150 g、収率; 30%)。本エキスを精製水に溶解後、ベンゼン 1 L を用いて振盪抽出する操作を 3 回繰り返し、脂質画分を除去した。得られた水層をさらに水飽和ブタノール 1.5 L を用いて振盪抽出する操作を 6 回繰り返し、ブタノール可溶性画分を得た。このブタノール可溶性画分を減圧乾固後、再度ブタノール 3 L に溶解し、約 1/5 にまで減圧濃縮し、析出した沈殿を粗サポニン画分として分取した (収量; 40 g、収率; 8%)。本粗サポニン画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにおいて水飽和ブタノールを用いて分画し、オンジサポニン D、E、F および G の混合物画分 (Fr. 1) とオンジサポニン A、B および C の混合物画分 (Fr. 2) を得た。この Fr. 1 と 2 を各々シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し [溶出液; クロロホルム-メタノール-エタノール-10% 酢酸=8:4:1:2 (上層を使用)]、Fr. 1 からは粗精製オンジサポニン F 画分、G 画分および D、E 混合物画分を、また Fr. 2 からは粗精製オンジサポニン A 画分、B 画分および C 画分を得た。オンジサポニン D、E 混合物画分はさらにシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分画し [溶出液; ブタノール-酢酸エチル-水=4:1:2 (上層を使用)]、粗精製オンジサポニン D 画分および E 画分を

得た。これらの粗精製オンジサポニン画分をさらにセファデックス LH-20を用いて精製し（溶出液；メタノール）、各々精製オンジサポニンA（収率；0.52%）、B（収率；0.77%）、C（収率；1.07%）、D（収率；0.29%）、E（収率；0.28%）、F（収率；0.94%）、およびG（収率；0.11%）を得た。

【0045】

実施例2. サポニンの調製-2

オンジサポニンA、E、FおよびGを製造するに際し、種々の高速液体クロマトグラフィー(HPLC)による製造方法を試みた。

【0046】

すなわちオンジ500gを精製水10 Lで液量が半量になるまで煎出した後、ステンレスメッシュを用いてろ過し、残渣については再度精製水10 Lを加え同様の操作を行った。抽出液は合わせてガラス繊維ろ紙を用いて濾過し、得られたろ液を凍結乾燥することにより熱水抽出エキスを得た。本熱水抽出エキス 133.90 g を精製水 1.79 Lで溶解させ、遠心分離することにより上清を得た。上清に4倍量のエタノールを加え、室温で一晩攪拌することによりエタノール沈殿を行った。沈殿を分別するため、この溶液を一日間静置することにより沈殿を沈降させ、上清と沈殿を分別し、さらに分別できなかった部分については遠心分離を行った。得られた上清を合わせてエタノールを減圧留去することにより、エタノール沈殿上清画分を得た。このエタノール沈殿上清画分を水 1 Lで再溶解した後、ヘキサン 600 Lを用いて振盪抽出し、脂質画分を除去した。水層について、さらにクロロホルム 1 L、次いで水飽和n-ブタノールを用いて振盪抽出し、溶媒を減圧留去することにより、クロロホルム可溶性画分およびブタノール 可溶性画分を得た。

【0047】

これらの、クロロホルム可溶性画分およびブタノール可溶性画分を水 1 Lで懸濁後、透析膜（排斥分子量10,000）を用いて、10日間精製水に対し透析し、透析内液の溶媒を減圧留去することにより、クロロホルム可溶性およびブタノール可溶性の非透析性活性画分を得た。得られた画分をハイドロキシアパタイトカラムを用いたHPLCにより水とアセトニトリルの混合溶媒を溶出液として分画し、オンジサポニンA、E、FおよびGの混合物を得た。

【0048】

更にこれらの活性混合物画分をフェニルカラムを用いたHPLCにより水とアセトニトリルの混合溶媒を溶出液として分画し、オンジサポニンA、E、FおよびGを含む画分を得た。なお、この精製法のうちハイドロキシアパタイトを用いたHPLCの過程を経なくてもオンジサポニンA、E、FおよびGは取得できる。

プレセネゲン母核のサポニンがアジュバントとして有効であることを確認する方法は、公知の生物学的方法による。オンジサポニンA、E、FおよびGが各種ワクチンに対し、抗体産生増強活性を有し、アジュバントとして有効であることを確認した実施例を以下に示す。

【0049】

実施例3. 鼻腔内接種されたインフルエンザHAワクチンに対する抗体産生増強作用

精製インフルエンザウイルス (A/PR/8/34株) よりエーテル処理によって脂質成分を除去して調製したHAワクチン (HA量として0.5mg/mL) と実施例1に記載した方法で精製したオンジサポニンA、E、FまたはGの生理食塩水溶液 (1 mg/mL) を等量混合することにより接種材料を調製した。なおここで用いたオンジサポニンの各分画における純度は、少なくとも約95%以上であった。BALB/cマウス (7週齢の雌) をアモバルビタールで麻酔後、左側鼻腔にマイクロピペットで20 μ Lの接種材料を滴下した。4週間後、エーテル麻酔条件下で、マウスの心臓より全採血によって血液を回収し、血清を調製した。血清は先ずRDE (receptor destroying enzyme, 受容体分解酵素) 処理によって非特異的赤血球凝集物質を除去した。この血清をU型マイクロタイタープレート上で2倍階段希釈し、16HA単位のウイルスと混合し、30分間室温放置後、鶏赤血球を加え、室温で1時間放置後、赤血球凝集抑制 (HI) 抗体価を判定した。

【0050】

図1はオンジサポニンA、E、FおよびGの血清中のHI抗体価に対する影響を示したものであるが、HAワクチンを単独で鼻腔内接種したときには、低いレベルのHI抗体しか検出されなかった。しかし、オンジサポニンA、EおよびFをHAワクチンと共に接種すると血清中のHI抗体価が、単独の場合よりも8~14倍上昇した。ま

た、オンジサポニンGもHI抗体価を3～5倍高めた。以上の結果は、オンジサポニンが、共存するインフルエンザHAワクチンに対する抗体産生を増強することを示している。

【0051】

実施例4. インフルエンザHAワクチンに対する二次抗体産生増強作用

実施例3と同様のインフルエンザHAワクチン (1mg/mL) と試料の生理食塩水溶液 (1mg/mL) を等量混合し、接種材料を調製した。雌性、7週齢のBALB/cマウスにアモバルビタルナトリウムを腹腔内接種して麻酔した。接種材料20 μ Lをマウスに経鼻接種した。マウスを3週間飼育後、ワクチンのみをさらに二次経鼻接種した。さらに1週間飼育後、血清および鼻腔洗液を調製した。血清中の抗インフルエンザウイルス抗体価はHI抗体価により測定した。鼻腔洗液は、放血後のマウスの左右の鼻腔より1 mLの0.1%牛血清アルブミン (BSA) を含むリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を2回ずつ灌流することによって回収した。鼻腔洗浄液中の抗HA-IgAおよび抗HA-IgG量は酵素免疫測定法 (ELISA) によって測定した。抗HA-IgAの定量の際には、コーティング緩衝液に懸濁したHAワクチン (5 μ g/mL) 50 μ Lで、先ず96穴のEIAプレート (リンブロー社製) の各孔 (well) をコーティングした。室温に2時間放置後、ツィーン20添加PBS (以下PBS-ツィーンと記す) でプレートを洗浄した。次に、1% BSAおよび0.1% NaN₃を含むPBS、100 μ Lで各孔をコーティングした。4℃に一昼夜放置後、PBS-ツィーンで洗浄し、次に各孔に100 μ LずつBSAおよび0.1% NaN₃を含むPBSで希釈したアルカリホスファターゼ標識山羊抗マウスIgA (α 鎖特異的、1:1000) を加えた。室温に1時間放置後、PBS-ツィーンで洗浄し、各孔に10%ジエタノールアミン緩衝液 (pH 9.8) に溶解したp-ニトロフェニルリン酸 (1 mg/mL; シグマ社製) を加えた。室温で20～30分放置後、発色をプレートリーダー (MRX-MD型、ダイネックス社製) を使ってO.D. (405 nm) で測定した。

【0052】

図2はオンジサポニンA, E, FおよびGの二次応答による血清中の抗インフルエンザウイルス抗体産生に対する影響を示したものである。オンジサポニンA, E,

FおよびGは血清中のHI抗体価をHAワクチン単独の場合よりも27～50倍上昇させた。また、これらオンジサポニンのアジュバント活性は陽性対照として用いた同用量のコレラトキシンBサブユニット (CTB; 公開特許広報(A) 平2-243633) と同程度であった。

【0053】

図3はオンジサポニンA, E, FおよびGの二次応答による鼻腔洗液中の抗インフルエンザウイルスIgAおよびIgG抗体産生に対する影響を示したものである。ワクチンのみを一次鼻腔内接種したときには、極めて低いレベルの抗HA-IgAおよびIgG抗体しか検出されなかった。これに対し、オンジサポニンAとワクチンを一次接種したグループではCTBとワクチンを一次接種したグループと同程度に最も強く鼻腔洗液中の抗HA-IgAおよびIgG抗体価を上昇させた。またオンジサポニンFも抗HA-IgAおよびIgG抗体産生を高めていたが、オンジサポニンEおよびGは抗HA-IgAのみを統計学的に有意に上昇させた。

【0054】

これらの結果は、一次接種に用いられたオンジサポニンが、二次接種による抗体産生を非常に強く誘導する作用があることを示している。即ち、オンジサポニンが共存するHAワクチンに対するメモリー効果を強く誘導する作用があることを示している。

【0055】

実施例5. 百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンに対する抗体産生増強作用
北里研究所製百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン (百日せき15 μ g/mL、破傷風2LF/mL、ジフテリア20LF/mL、水酸化アルミニウムゲル0.27mg/mLを含む) と実施例3で用いたオンジサポニンの生理食塩水溶液 (1 mg/mL) を混合し、接種材料を調製した。雌性、7週齢のBALB/cマウスにアモバピタールナトリウムを腹腔内接種して麻酔した。接種材料20 μ Lをマウスに経鼻接種し、さらに4週間後に同量のワクチンのみを追加接種した。マウスを2週間飼育後、血清および鼻腔洗液を採取した。血清中の抗百日せきトキシン (PT) -IgG、抗ジフテリアトキソイド (DT) -IgG、抗破傷風トキソイド (TT) -IgG抗体価および鼻腔洗液中の抗PT-IgA、抗DT-IgAおよび抗TT-IgA抗体価はELISAにより測定した。

【0056】

図4はオンジサポニンA, E, FおよびGの血清中の抗PT-IgG、抗DT-IgGおよび抗TT-IgG抗体価に対する影響を示したものであるが、百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンのみを接種したグループでは、抗PT-IgG抗体価、抗DT-IgG抗体価、抗TT-IgG抗体価はいずれも低レベルであったのに対し、オンジサポニンAをワクチンに添加したものを一次接種したグループおよびCTB（コレラトキシンBサブユニット）をワクチンに添加したものを一次接種したグループは同程度に最も強く血清中の抗PT-IgG、抗DT-IgGおよび抗TT-IgG抗体価を上昇させた。オンジサポニンFも血清中の抗PT-IgG、抗DT-IgGおよび抗TT-IgG抗体価を高めていたが、オンジサポニンGは血清中の抗TT-IgG抗体価のみを統計学的に有意に上昇させた。キラジャ・サポナリアの樹皮由来のサポニン混合物キルAは他の試料と同量用いても全く血清中の抗PT-IgG、抗DT-IgGおよび抗TT-IgG抗体価に対してアジュバント活性を示さなかった。

【0057】

図5はオンジサポニンA, E, FおよびGの鼻腔洗液中の抗PT-IgA、抗DT-IgAおよび抗TT-IgA抗体価に対する影響を示したものである。百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンのみを接種したグループでは、抗PT-IgA抗体価、抗DT-IgA抗体価、抗TT-IgA抗体価は、いずれも低レベルであったのに対し、オンジサポニンAまたはFをワクチンと共に一次接種したグループではCTBをワクチンと共に一次接種したグループと同程度に最も強く鼻腔洗液中の抗PT-IgA、抗DT-IgAおよび抗TT-IgA抗体価を上昇させた。また、オンジサポニンGは鼻腔洗液中の抗DT-IgAおよび抗TT-IgA抗体価を高めていた。キルAは鼻腔洗液中の抗PT-IgA抗体価を弱く上昇させたが、抗DT-IgAおよび抗TT-IgA抗体価に対してはアジュバント活性を示さなかった。

【0058】

実施例6. 活性サポニンの溶血性試験

一般にサポニン類は溶血活性を示すことが知られている。そこで、本発明の活性サポニンの溶血活性を検討するために以下のように溶血性を測定した。

綿羊赤血球をリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)で3回洗浄後、同緩衝液で2.5倍希釈

し実験に用いた。オンジサポニンA、E、FおよびGの水溶液(200, 100, 50, 25, 6.25, 3.125 $\mu\text{g/mL}$ -PBS溶液) 100 μL を分注した96穴のV底マイクロプレートに25 μL の綿羊赤血球懸濁液を加え、30分間室温で放置した後、1000 rpmで5分間遠心した。その上清50 μL を平底プレートに移し、マイクロプレートリーダー(モデル450、バイオラッド社製)で490 nmの吸光度を測定した。試験化合物の溶血活性は、綿羊赤血球からのヘモグロビンの放出による490 nmの吸光度の上昇で判定した。図6はオンジサポニンA、E、FおよびGの溶血活性を示したものである。各化合物の間で溶血性に大きな違いが認められた。オンジサポニンEおよびFでは終濃度が200 $\mu\text{g/mL}$ においてもほとんど溶血性は認められなかったのに対し、オンジサポニンGでは中間程度の溶血性が認められ、オンジサポニンAは明らかに溶血性を示した。

【0059】

実施例7. インフルエンザHAワクチン-オンジサポニン製剤(注射剤)の調製
インフルエンザHAワクチン(HA 1 mg/mL)と、PBSに溶解し濾過滅菌したオンジサポニンEとFを含む画分を混合し、0.5 mL中にインフルエンザHAワクチン5~10 μg とオンジサポニン10 μg を含む様に調製した。これを容器に分注して、インフルエンザHAワクチン-オンジサポニン注射剤とした。本品は10℃以下の冷暗所に保存することができる。

上記のように調製したインフルエンザHAワクチンおよびサポニンをマウスに接種し、4週間後の抗体産生を調べた。試験成績から、インフルエンザHAワクチンのみを接種されたマウスで血中のHI抗体は、 2^8 であったのに対し、サポニン添加ワクチンでは、 $2^{11.6}$ であった。

【0060】

実施例8. 百日せきワクチン-オンジサポニン製剤(点鼻剤)の調製
百日せきワクチンと、PBSに溶解し濾過滅菌したオンジサポニンFを混合し、20 μL 中に百日せきワクチンが蛋白質窒素として15 μg とオンジサポニンを10 μg 含むように調製した。これに防腐剤(0.005%チメロサル)を加え、容器に分注して、百日せきワクチン-オンジサポニン経鼻接種剤とした。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した百日せきワクチンおよびサポニンをマウスの鼻腔内に接種し、さらに4週間後に同量のワクチンを追加接種し、抗体産生を調べた。試験成績から、百日せきワクチンのみを接種されたマウスでは、血中の抗PT-IgG抗体は、156.3 ELISA単位であったのに対し、サポニンを添加したものでは、334.2 ELISA単位であった。また、鼻腔洗液中の抗PT-IgA抗体は、百日せきワクチンのみを接種されたマウスでは、6 ELISA単位であったのに対し、サポニン添加ワクチンでは、12 ELISA単位であった。

【0061】

実施例9. B型肝炎ワクチン-オンジサポニン製剤（注射剤）の調製

B型肝炎ワクチンと、PBSに溶解し濾過滅菌したオンジサポニンFとGを含む画分を混合し、1 mL中にHBs抗原が蛋白質として40 μ gと、オンジサポニン10 μ gを含むように調製した。これに防腐剤（0.01%チメロサル）および安定剤（0.2%豚製ゼラチン）を加え、容器に分注してB型肝炎ワクチン-オンジサポニン注射剤とした。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したB型肝炎ワクチンおよびサポニンをマウスに接種し、3週間後の血中の抗体産生を調べた。試験成績から、B型肝炎ワクチンのみを接種されたマウスでは、受身赤血球凝集反応で、 $2^{3.6}$ 単位であったのに対し、サポニンを添加したものでは $2^{6.2}$ 単位であった。

【0062】

実施例10. 日本脳炎ワクチン-オンジサポニン製剤（注射剤）の調製

日本脳炎ワクチンと、PBSに溶解し濾過滅菌したオンジサポニンFとGを含む画分を混合し、1 mL中に $10^{7.0}$ PFU相当量の不活化日本脳炎ウイルス粒子と、オンジサポニン10 μ gを含むように調製した。これに安定剤（0.2%豚製ゼラチン）を加え、容器に分注して日本脳炎ワクチン-オンジサポニン注射剤とした。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した日本脳炎ワクチンおよびサポニンを1週間隔で2回マウスに接種し、血中の抗体量をみた。試験成績から、日本脳炎ワクチンのみを接種した場合に産生される中和抗体価は $10^{1.88}$ であったのに対し、サポニンを添加したものでは $10^{2.90}$ であった。

【0063】

実施例11. 麻しんワクチン-オンジサポニン製剤（点鼻剤）の調製

麻しんワクチンと、PBSに溶解し濾過滅菌したオンジサポニンEを混合し、20 μ L中に麻しんワクチン20 μ g相当量のウイルス粒子と、オンジサポニン2.5 μ gを含むように調製した。これに安定剤（0.2%豚製ゼラチン、0.1%グルタミン酸ナトリウム、5%乳糖）を加え、容器に分注して麻しんワクチン-オンジサポニン点鼻剤とした。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した麻しんワクチンおよびサポニンを3週間隔で2回マウスに接種し、血中の抗体産生をみた。試験成績から、麻しんワクチンのみを接種した場合に産生されるELISA抗体価は0.18であったのに対し、サポニン添加ワクチンは、0.25であった。

【0064】

実施例12. 風しんワクチン-オンジサポニン製剤（点鼻剤）の調製

風しんワクチンと、PBSに溶解し濾過滅菌したオンジサポニンEを混合し、20 μ L中に風しんワクチン20 μ g相当量のウイルス粒子と、オンジサポニン2.5 μ gを含むように調製した。これに安定剤（0.1%グルタミン酸ナトリウム、5%乳糖）を加え、容器に分注して風しんワクチン-オンジサポニン点鼻剤とした。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した風しんワクチンおよびサポニンを3週間隔で2回マウスに接種し、血中の抗体産生をみた。試験成績からワクチンのみを接種した場合に産生されるELISA抗体価は0.13であったのに対し、サポニン添加ワクチンは、0.850であった。

【0065】

実施例13. おたふくかぜワクチン-オンジサポニン製剤（点鼻剤）の調製

おたふくかぜワクチンと、PBSに溶解し濾過滅菌したオンジサポニンEを混合し、20 μ L中におたふくかぜワクチン20 μ g相当量のウイルス粒子と、オンジサポニンを2.5 μ g含むように調製した。これに安定剤（0.2%豚製ゼラチン、0.1%グルタミン酸ナトリウム、5%乳糖）を加え、容器に分注して、おたふくかぜワクチン-オンジサポニン点鼻剤とした。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したおたふくかぜワクチンおよびサポニンを3週間隔で2回マウスに接種し、血中の抗体産生をみた。試験成績からワクチンのみを接種した場合に産生されるELISA抗体価は0.023であったのに対し、サポニン添加ワクチンは、0.045であった。

【0066】

実施例14. 麻しん風しん混合ワクチン-オンジサポニン製剤（点鼻剤）の調製

麻しん風しん混合ワクチンと、PBSに溶解し濾過滅菌したオンジサポニンEを混合し、20 μ L中に各々のワクチン7 μ g相当量のウイルス粒子と、オンジサポニンを2.5 μ g含むように調製した。これに安定剤（0.2%豚製ゼラチン、0.1%グルタミン酸ナトリウム、5%乳糖）を加え、容器に分注して、麻しん風しん混合ワクチン-オンジサポニン点鼻剤とした。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製した麻しん風しん混合ワクチンおよびサポニンを3週間隔で2回マウスに接種し、血中の抗体産生をみた。試験成績から、ワクチンのみを接種した場合に産生されるELISA抗体価は麻しん、風しんのそれぞれは、0.14、0.090であったのに対し、サポニン添加ワクチンは、各々0.30、0.29であった。

【0067】

実施例15. ロタワクチン-オンジサポニン製剤（経口、点鼻剤）の調製

ロタワクチンと、PBSに溶解し濾過滅菌したオンジサポニンEとFを含む画分を混合し、20 μ L中にロタワクチン3.3 μ g相当量のウイルス粒子と、オンジサポニンを10 μ g含むように調製した。これを容器に分注して、ロタワクチン-オンジサポニン経口、点鼻剤とした。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したロタワクチンおよびサポニンを3週間隔で2回マウスに接種し、血中の抗体産生をみた。試験成績から、ワクチンのみを接種した場合に産生されるELISA抗体価は、点鼻接種の場合、0.089であったのに対し、サポニン添加ワクチンは、0.38であり、また、経口接種の場合、0.018であったのに対し、サポニン添加ワクチンは、0.27であった。

【0068】

実施例16. マイコプラズマワクチン-オンジサポニン製剤（注射剤）の調製

マイコプラズマワクチンと、PBSに溶解し濾過滅菌したオンジサポニンEとFを含む画分を混合し、1 mL中にマイコプラズマワクチン 2.0×10^{10} CFU（コロニー形成単位）相当量のウイルス粒子と、オンジサポニンを10 μ g含むように調製した。これを容器に分注して、マイコプラズマワクチン-オンジサポニン注射剤とした。本品は10℃以下の冷暗所に保存する。

上記のように調製したマイコプラズマワクチンおよびサポニンを2週間隔で3回マウスに接種し、マイコプラズマ感染攻撃後病変をみた。試験成績から、ワクチンのみを接種されたマウスは10匹すべてに病変が認められたのに対し、サポニンを添加したものでは10匹当たり3匹のみに病変が認められた。病変数の平均値では、ワクチンのみでは277であったのに対し、サポニン添加ワクチンでは142であった。

【0069】

【発明の効果】

以上の実施例により次のことが明らかである。

1. オンジサポニンで構成される本発明のアジュバントは、共存するインフルエンザHAワクチンおよび百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンに対する抗体産生を増強する。
2. ワクチン抗原を本発明によるアジュバントとともに鼻腔ルートで接種すると、血中の抗体産生と共に局所（鼻腔洗浄液）の抗体産生も増強される。換言すれば本発明のアジュバントを使用することによって、ワクチン抗原の接種量を減少させることができ、副反応の軽減につながる。
3. オンジサポニンを含む本発明のアジュバントは、血中及び局所（鼻腔洗浄液）で、キラジャ・サポナリアの樹皮由来のサポニン混合物キルAよりも高い抗体産生増強活性を示すことから、キルAよりも強力なアジュバントである。
4. 本発明のアジュバントは、たとえばオンジサポニンEおよびFの様に、溶血活性を実質的に検出できない成分を含む。本発明の実施例によって明らかにされたとおり、一般に溶血活性が強いとされているサポニンではあるが、特定の化合物にあっては溶血活性を示さない。溶血活性を持たないサポニンが、他のサポニンから分離可能であり、しかもアジュバント活性を併せ持っていることを示した点

において、本発明の成果は大きい。

以上に説明したように、本発明によるアジュバントを含むワクチン製剤は、ウイルスおよび細菌感染の予防あるいは治療に有効で、しかも安全性に優れた薬剤として期待される。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを用いたものを経鼻接種したときの血清中の一次抗体産生の結果を示すグラフ。図中、縦軸は抗体価 (2^n) を、横軸は接種したワクチンの種類を示す。

【図 2】

本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを用いたものを経鼻接種したときの血清中の二次抗体産生の結果を示すグラフ。図中、縦軸は抗体価 (2^n) を、横軸は使用したアジュバントの種類を示す。

【図 3】

本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを用いたものを経鼻接種したときの鼻腔洗液中の二次抗体産生の結果を示すグラフ。図中、縦軸は抗体価 (ELISA 単位) を、横軸は使用したアジュバントの種類を示す。

【図 4】

本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとして百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンを用いたものを経鼻接種したときの血清中の二次抗体産生の結果を示すグラフ。図中、縦軸は抗体価 (ELISA 単位) を、横軸は使用したアジュバントの種類を示す。

【図 5】

本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとして百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンを用いたものを経鼻接種したときの鼻腔洗液中の二次抗体産生の結果を示すグラフ。図中、縦軸は抗体価 (ELISA 単位) を、横軸は使用したアジュバントの種類を示す。

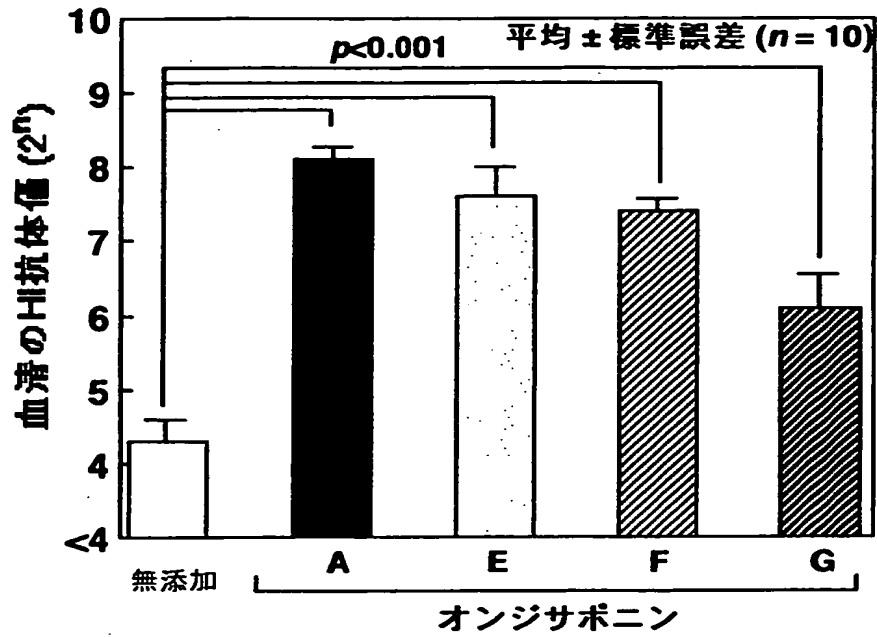
【図 6】

本発明によるアジュバントの溶血活性を示すグラフ。図中、縦軸は 405nm にお

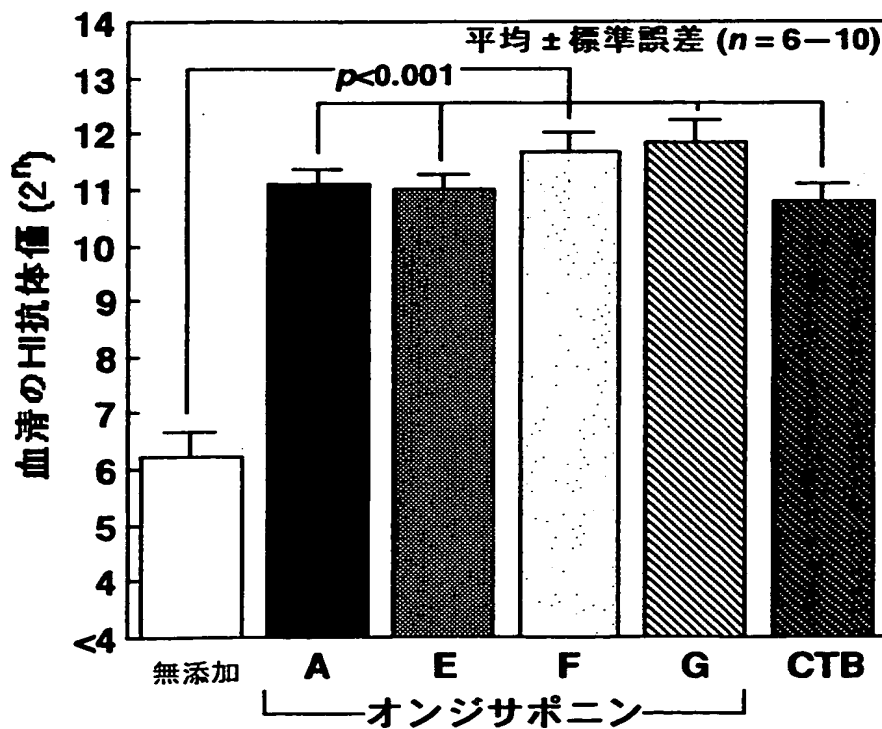
ける吸光度を、横軸はサポニンの最終濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を示す。

【書類名】 図面

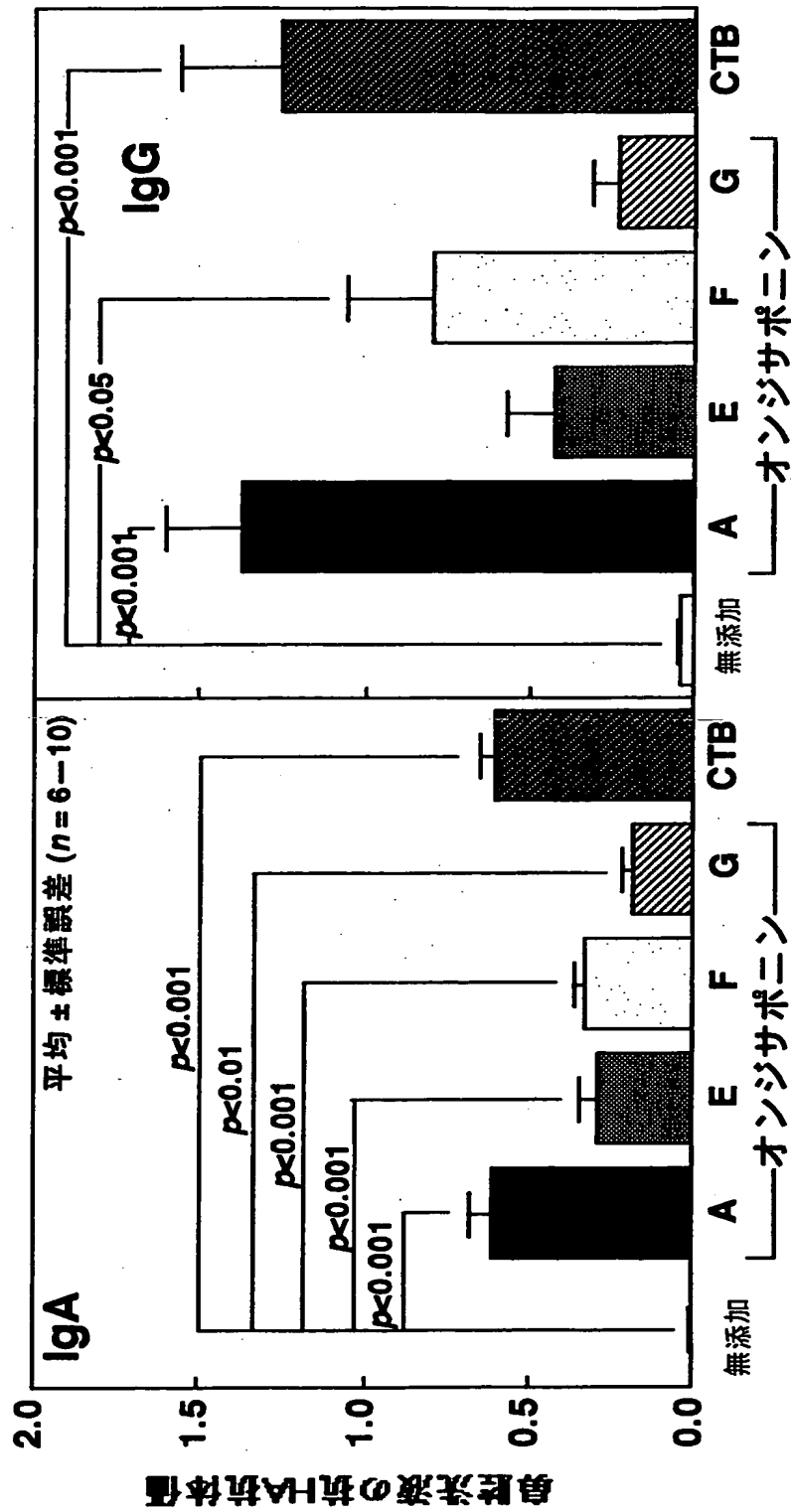
【図1】



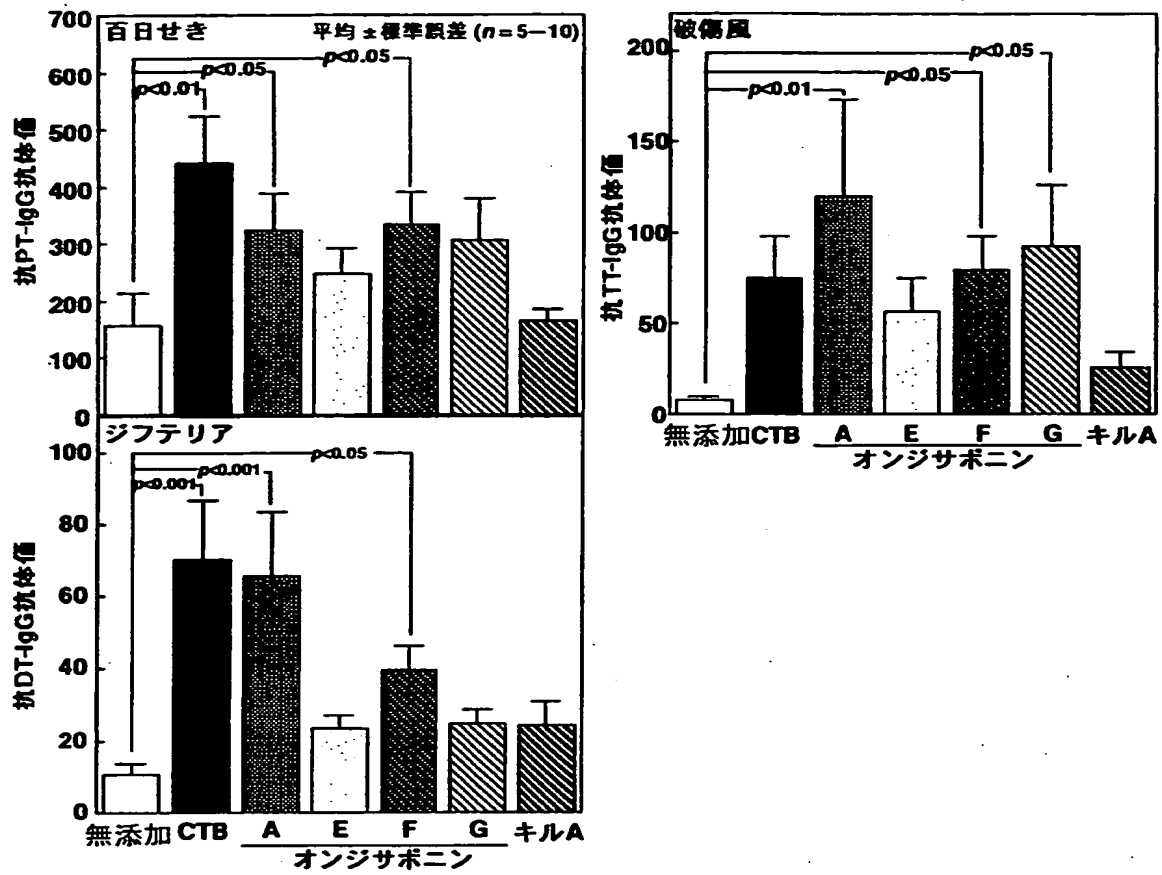
【図2】



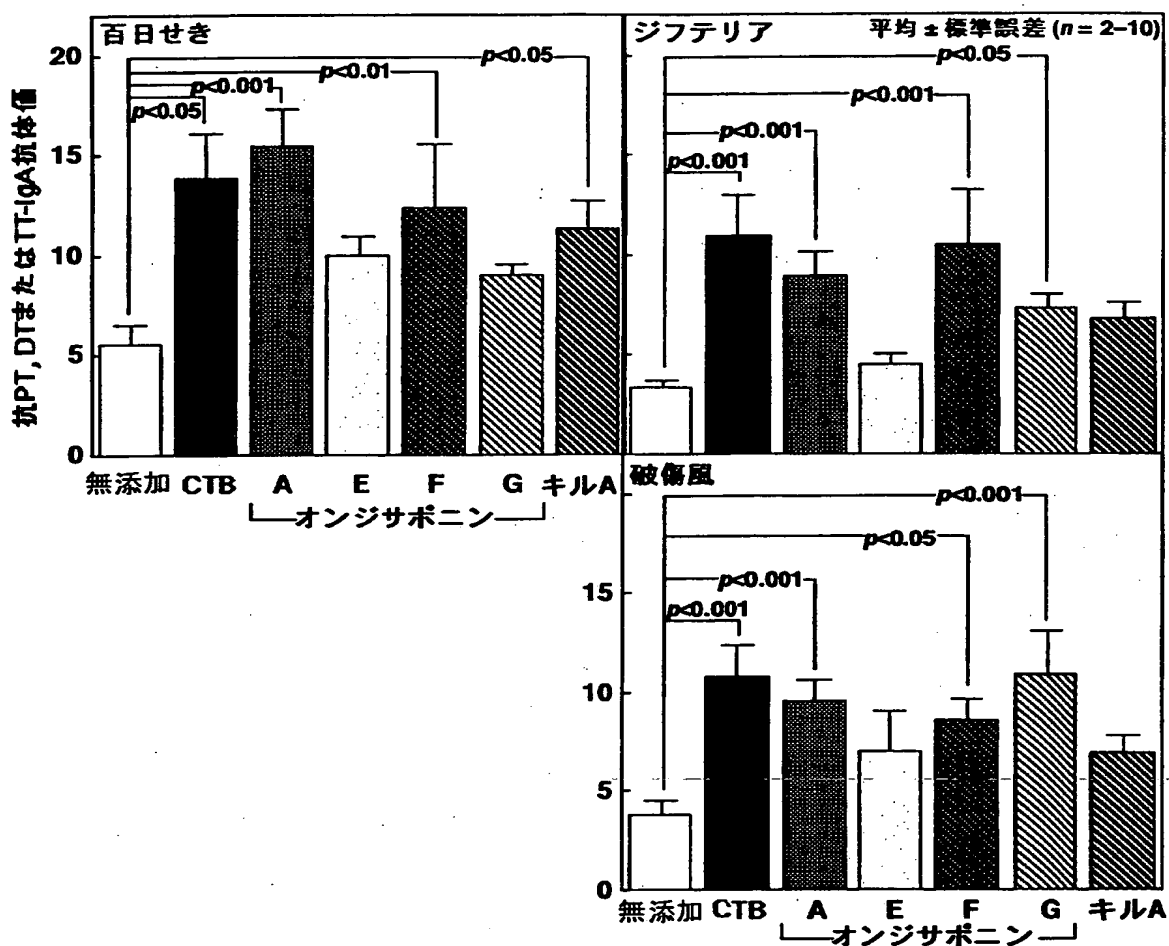
【図 3】



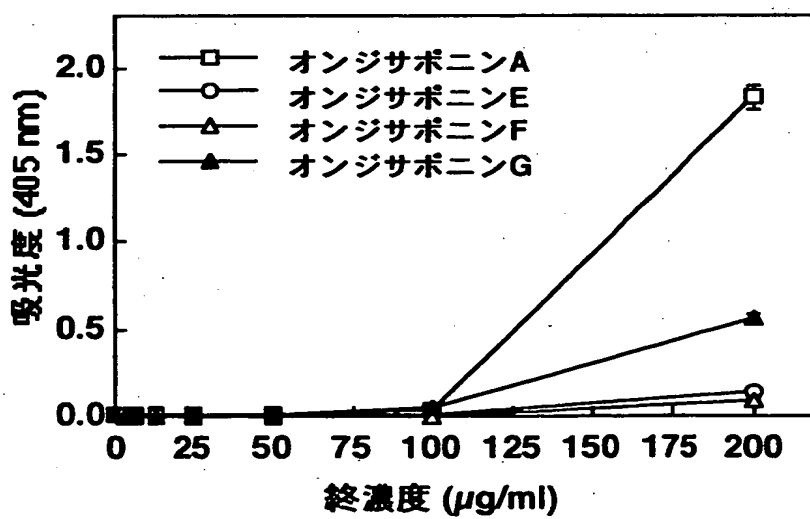
【図 4】



【図 5】



【図6】



【書類名】 要約書

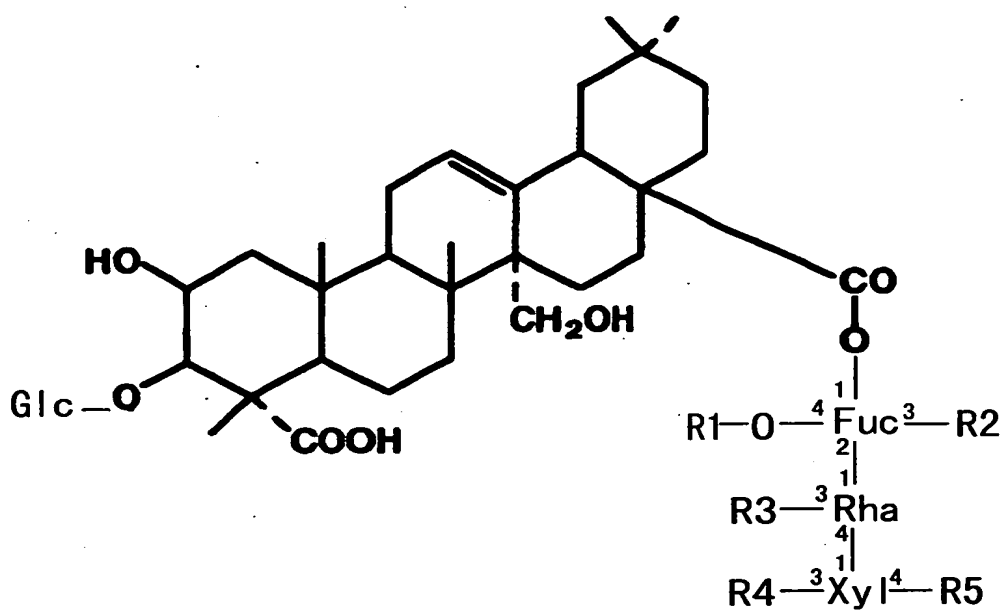
【課題】

本発明は、免疫刺激活性と安全性に優れたアジュバントと、このアジュバントを用いたワクチンの提供を課題とする。

【解決手段】

プレセネゲニン骨格を母核とし、その28位が糖残基または置換糖残基によって置換されているサポニンを有効成分として含むアジュバント、ならびにこのアジュバントを含むワクチン製剤により、前記課題を解決する。たとえば下記の構造を持つサポニンの利用により、経鼻接種においても十分な免疫刺激活性を示す。

【化3】



【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】
【識別番号】 390027214
【住所又は居所】 東京都港区白金5丁目9番1号
【氏名又は名称】 社団法人北里研究所
【代理人】 申請人
【識別番号】 100102978
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
清水国際特許事務所
【氏名又は名称】 清水 初志
【選任した代理人】
【識別番号】 100108774
【住所又は居所】 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階
清水国際特許事務所
【氏名又は名称】 橋本 一憲

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [390027214]

1. 変更年月日	1992年 4月 3日
[変更理由]	名称変更
住 所	東京都港区白金5丁目9番1号
氏 名	社団法人北里研究所